

جداسازی مولکولی ژن *stf* از باسیلوس‌های خاک‌زی گرمادوست و کلونینگ آن در سلول مستعد به منظور استفاده در صنعت

مریم پورمهدی^۱، نوشین خندان‌دزفولی^{۲*}، کیومرث امینی^۳

چکیده

زمینه و هدف: باسیلوس‌های ترموفیل، حامل ژن‌های مختلف و بیوسورفکتانت‌ها می‌باشد. سورفکتانت‌های میکروبی مولکول‌های فعال سطحی هستند که توسط انواع میکروارگانیسم‌ها از جمله باکتری‌ها، مخمرها و قارچ‌های رشته‌ای تولید می‌شوند. بیوسورفکتانت‌ها قادر به کاهش انرژی سطحی بین فازها و ایجاد موانع الکترواستاتیکی هستند و در نتیجه از ادغام ذرات جلوگیری می‌کنند. هدف از مطالعه‌ی حاضر، جداسازی مولکولی ژن *stf* از باسیلوس‌های خاک‌زی گرمادوست و کلونینگ آن در سلول مستعد به منظور استفاده در صنعت است.

روش بررسی: ۱۵ نمونه خاک مناطق مختلف کرمان جمع‌آوری و به منظور جداسازی سویه‌های باسیلوس غربال شدند. مطالعات مورفولوژیکی و بیوشیمیایی جهت شناسایی سویه‌ها انجام شد. پس از بررسی بیوشیمیایی جدایه‌های میکروبی جداسازی شده و تأیید سویه‌های باسیلوس، استخراج DNA صورت گرفت. سپس با روش PCR ژن *stf* از این جدایه‌ها شناسایی گردید. قطعه تکثیر یافته توسط روش TA کلونینگ به داخل وکتور pTG19 وارد شد. سپس وکتور نو ترکیب به باکتری *E. coli* سویه اوریگامی ترانسفورم و با استفاده از روش‌های رایج تأیید کلونینگ صورت گرفت. ژن خانگی 16S rRNA به عنوان کنترل داخلی تست استفاده شد. بررسی میزان بیان ژن با اندازه‌گیری نسبی بیان mRNA در مقایسه با کنترل منفی که باکتری *E. coli* فاقد ژن *stf* بود، انجام شد.

یافته‌ها: در مجموع، ۱۲ جدایه باسیلوس‌های ترموفیل از نمونه‌های خاک به دست آمد. در نتیجه‌ی واکنش PCR برای ژن *stf* با پرایمرهای طراحی شده ۱ جدایه (۸/۳٪) مثبت رویت شد. حضور ژن *stf* و بیان این ژن توسط آزمون Real time PCR بررسی شد. بررسی کلنی‌های سفید و آبی، پرایمر M13، محل اتصال و تعیین توالی ژن 16S rRNA تأییدکننده‌ی صحت کلونینگ ژن مذکور در باکتری میزبان بود.

نتیجه‌گیری: مطالعه‌ی حاضر، موفق به شناسایی باسیلوس گرمادوست بومی حامل ژن *stf* بود که جهت دستیابی گسترده، راحت و مقرون به صرفه به آنزیم بیوسورفکتانت، جهت استفاده در مصارف صنعتی، کشاورزی، حذف آلاینده‌های نفتی و کاهش کشش سطحی محیطی می‌باشد که می‌توان از آن در صنایع مذکور بهره برد.

واژه‌های کلیدی: بیوسورفکتانت، باسیلوس‌های ترموفیل، کلونینگ، اشریشیاکلی

دریافت مقاله: ۱۴۰۲/۴/۱۶

پذیرش مقاله: ۱۴۰۳/۶/۲۰

* نویسنده مسئول:

نوشین خندان‌دزفولی؛

واحد سیرجان دانشگاه آزاد اسلامی

Email:

khandan22@iau.ac.ir

۱ کارشناس ارشد میکروبیولوژی، واحد سیرجان، دانشگاه آزاد اسلامی، سیرجان، ایران

۲ استادیار گروه میکروبیولوژی، واحد سیرجان، دانشگاه آزاد اسلامی، سیرجان، ایران

۳ استاد گروه میکروبیولوژی، واحد ساوه، دانشگاه آزاد اسلامی، ساوه، ایران

گرفته‌اند، سورفاکتین‌ها هستند که ممکن است قوی‌ترین بیوسورفاکتانت‌های شناخته‌شده و حاوی هپتاپپتیدهای متصل به اسید چرب β -هیدروکسی با تعداد کربن در محدوده ۱۳ تا ۱۵ باشند (۷). علاوه بر این، با توجه به تولید بیوسورفاکتانت، سویه‌های خاصی از گونه‌های باسیلوس سوتیلیس، باسیلوس موجاونسیس، باسیلوس سنورنسیس، و باسیلوس لیکنیورمیس، بیوسورفاکتانت‌های لیوپپتیدی حلقوی، سورفاکتین و لیکنیزین را تولید می‌کنند از باسیلوس سوتیلیس یک بیوسورفاکتانت لیوپپتیدی شناخته شده به نام سورفاکتین تولید می‌شود که توسط چهار ناحیه چارچوب خواندن باز (ORFs) به نام‌های *stfA*، *stfB*، *stfC* و *stfD* کدگذاری می‌شود (۸). میکروارگانیسم‌های ترموفیل به دلیل اهمیت فراوان در صنعت و به دلیل توانایی آن‌ها برای عملکرد در شرایط محیطی سخت و شدید شناخته شده‌اند. هدف از مطالعه‌ی حاضر جداسازی مولکولی ژن *stf* از باسیلوس‌های خاک‌زی گرم‌دوست و کلونینگ آن در سلول باکتری مستعد (اوریگامی) به منظور استفاده در صنعت است.

روش بررسی

• نمونه‌برداری

در این تحقیق ۱۵ نمونه خاک از مناطق کویری در اطراف کرمان واقع در ایران جمع‌آوری شد. نمونه‌برداری با رعایت شرایط آسپتیک از عمق ۲۰-۱۰ سانتی متری لایه فوقانی خاک و از پنج مکان تصادفی در ظروف استریل ذخیره شد و به آزمایشگاه منتقل شدند. نمونه‌ها برای انجام بررسی‌های بعدی در دمای 4°C نگهداری شده و به آزمایشگاه میکروبی‌شناسی پاسارگاد تهران منتقل شدند. مشخصات، محل نمونه‌برداری و تاریخ آن بر روی ظروف حاوی نمونه‌ها یادداشت شد. برای آماده‌سازی ظروف مخصوص نمونه‌برداری به حجم ۰/۵ تا ۱ لیتر پس از اسیدشویی چندین بار با آب مقطر شسته و جهت استریل کامل در 121°C اتوکلاو شدند.

• جداسازی جنس باسیلوس ترموفیل

جهت جداسازی باسیلوس‌های ترموفیل از تکنیک *Heat enrichment culture* یا پاستوریزاسیون استفاده شد (۹) و در ادامه برای خالص‌سازی آن‌ها از کشت به روش پورپلیت یا کخ استفاده شد (۱۰). نمونه‌ها پس از انتقال به آزمایشگاه به وسیله الکاستریلی به قطر ۲ میلی‌متر الک شدند. یک گرم خاک الک شده به داخل لوله‌های آزمایش در پیچ‌دار ریخته و به آن ۹ میلی‌لیتر آب مقطر استریل اضافه شد. سپس نمونه‌های سوسپانسیون خاک در بن ماری با درجه حرارت

جنس باسیلوس باکتری‌های گرم مثبت، هوازی و میله‌ای شکل هستند و بیش از ۳۰۰ گونه را شامل می‌شود که بسیاری از آن‌ها از نظر صنعتی مهم هستند (۱). اعضای جنس باسیلوس شامل باکتری‌های گرم مثبت، اسپورساز، میله‌ای شکل و هوازی است. گونه‌های باسیلوس از نظر فنوتیپی و ژنوتیپی ناهمگن هستند. بسیاری از گونه‌های باسیلوس تولیدکنندگان معروفی برای ترکیبات ضد میکروبی مختلف مانند باکتریوسین‌ها و لیوپپتیدها به‌شمار می‌روند. ترکیبات ضد میکروبی معروف سنتز شده توسط گونه‌های باسیلوس باکتریوسین‌ها با مواد شبه باکتریوسین هستند (۲) باکتریوسین‌ها، پپتیدها یا پروتئین‌هایی با فعالیت ضد میکروبی در برابر گونه‌های نزدیک تولیدکننده هستند. اما باکتریوسین‌ها از نظر خواصی مانند وزن مولکولی، اصلاح پس از تولید، خواص بیوشیمیایی، طیف ضد میکروبی و نحوه‌ی عملکرد متفاوتند (۳). بیوسورفاکتانت‌ها یا سورفاکتانت‌های میکروبی مولکول‌های فعال سطحی هستند که توسط انواع میکروارگانیسم‌ها از جمله باکتری‌ها، مخمرها و قارچ‌های رشته‌ای تولید می‌شوند. به دلیل ماهیت آمفی‌پاتیک، این بیومولکول‌ها کشش سطحی بین فاز آبی و مولکول‌های آب‌گریز را کاهش داده و در نتیجه حلالیت و فراهمی زیستی ترکیبات آلی آب‌گریز را افزایش می‌دهند (۴). در مقایسه با سورفاکتانت‌های شیمیایی مصنوعی، بیوسورفاکتانت‌ها به دلیل سطح بالای فعالیت، فعالیت خاص در دماهای شدید، pH و شوری، توانایی تولید از مواد اولیه تجدیدپذیر و درجه بالای تجزیه‌پذیری زیستی مورد توجه هستند (۵) با این حال، بیوسورفاکتانت‌ها به دلیل بازده تولید پایین و هزینه‌های بالای تصفیه هنوز به‌طور گسترده تجاری نشده‌اند. به‌منظور حل این مشکلات، مطالعات زیادی با استفاده از مواد اولیه کم‌هزینه یا محصولات جانبی کشاورزی به‌عنوان بستر تولید بیوسورفاکتانت انجام شده است. منابع کربن کم‌هزینه که برای تولید بیوسورفاکتانت توسط میکروارگانیسم‌ها استفاده شده‌اند، عبارتند از: لجن روغن پالم، فاضلاب کاساوا، ضایعات پالایشگاه روغن نباتی، ملاس و گلیسرول خام. استفاده از گلیسرول خام به‌عنوان ماده اولیه برای تولید مواد شیمیایی می‌تواند برای صنعت بیودیزل یک خروجی ارزش افزوده برای مقادیر زیادی محصول جانبی گلیسرول خام فراهم کند (۶).

یکی از کاربردهای احتمالی گلیسرول خام، استفاده از آن به‌عنوان منبع کربن و انرژی برای تولید بیوسورفاکتانت توسط باسیلوس‌ها و سایر میکروارگانیسم‌هاست (۷). خانواده‌ی لیوپپتیدهایی که بیشتر مورد مطالعه قرار

آگار (محیط نوترینت آگار) به روش پورپلیت کشت داده شد، سپس پلیت‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت در شرایط هوازی انکوبه شدند (۱۱) • تعیین هویت جدایه‌های باکتریایی مشکوک به جنس *باسیلوس ترموفیل*

۸۰°C به مدت ۵ دقیقه قرار داده شد. به این ترتیب تنها باکتری‌های اسپورداز خاک باقی ماندند (شامل *باسیلوس* ها و *کلوستریا*، یوم‌ها). سپس ۹ رقت پشت سر هم (سریالی) تهیه شد و یک میلی‌لیتر از ۳ رقت آخر برداشته و در پلیت کانت

جدول ۱: تست‌های بیوشیمیایی تفریقی مورد استفاده برای تشخیص جنس *باسیلوس ترموفیل*

ردیف	آزمایش	عملکرد باکتری <i>باسیلوس</i>
۱	رنگ‌آمیزی گرم	Pos
۲	متیل رد	Pos
۳	وگس پرسکوئر	Pos
۴	سیمون سیترات	Pos
۵	اکسیداز	Neg
۶	کاتالاز	Pos
۷	اندول	Neg
۸	اوره آز	Neg
۹	تریپل شوگر آبیرون آگار	Pos
۱۰	احیای نیترات	Neg

• پرایمرها و انجام واکنش PCR

استخراج DNA از کلنی *باسیلوس* با استفاده از کیت تجاری شرکت پیشگامان (ایران) انجام شد. روی پرایمرها جایگاه شناسایی آنزیم‌های BamHI و EcoRI تعبیه شد. ژن *srf*، از طریق واکنش زنجیرهای پلیمرز PCR افزایش یافت.

تست‌های تکمیلی مطالعات بیوشیمیایی از جمله تست کاتالاز و رنگ‌آمیزی گرم و نیز تست‌های نیترات، هیدرولیز نشاسته و تأثیر صفرا بر باکتری جهت شناسایی جنس *باسیلوس ترموفیل* استفاده شد (جدول ۱). تست‌های بیوشیمیایی جهت شناسایی *باسیلوس ترموفیل* در جدول یک، قابل مشاهده است.

جدول ۲: پرایمر استفاده شده (۱۲) جهت تشخیص ژن *srf*

ژن	توالی (5'→3')	اندازه نوکلئوتید bp
<i>srf</i>	Forward: 5'- AGGCAAGCAAGCCTCTGGCG -3'	۵۸۰
	Reverse: 5'- CTTGTCCGCACAGGCACCGT -3'	

جهت ژن *srf*، براساس انتهای ۳' و ۵' توالی آن یک جفت پرایمر: Forward: 5'- AGGCAAGCAAGCCTCTGGCG -3' و Reverse: 5'- CTTGTCCGCACAGGCACCGT -3' طراحی و سنتز شد (جدول ۲).

جدول ۳: پرایمرهای 16S rRNA مورد استفاده در این پژوهش

پرایمر	توالی پرایمر (5' to 3')	اندازه باند (bp)
16s-F	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	متغیر
16s-R	AAGGAGGTGATCCAGCCGCA	متغیر

میلی مولار $MgCl_2$ ، ۰/۲ میلی مولار dNTP، بافر PCR 1x، ۱/۲۵ واحد آنزیم Taq DNA polymerase (شرکت Thermo Fisher Scientific - آمریکا)،

به منظور انجام واکنش PCR حجم نهایی واکنش ۲۵ میکرولیتر بوده که شامل ۱ میکرولیتر DNA باکتری (به عنوان الگو)، ۱۰ پیکومول از هر پرایمر، ۱/۵

محصولات PCR قبل و بعد از انجام فرایند کلونینگ انجام شد.

• تعیین میزان بیان ژن *srf* در باکتری های نو ترکیب حاصل با روش

Real Time PCR

به منظور تأیید کارایی فرایند کلونینگ، لازم است که بیان ژن کلون شده در کلونی های حاصل ارزیابی گردد. بدین منظور استخراج RNA توسط میکروکیت RNeasy (خریداری شده از شرکت سیناکلون) از سوسپانسیون باکتریایی کلونی های سفید در فاز نمایی رشد انجام گرفت. سنتز cDNA با استفاده از آنزیم AMV Reverse Transcriptase و واکنش Real Time PCR با استفاده از کیت شرکت Genet bio کره جنوبی به انجام رسید. ژن خانگی *16sr* به عنوان کنترل داخلی تست استفاده شد. آنالیز میزان بیان با اندازه گیری نسبی بیان mRNA در مقایسه با کنترل منفی که باکتری *E. coli* فاقد ژن *srf* بود، انجام شد.

• رسم درخت فیلوژنی

با استفاده از پرایمرهای ارایه شده PCR ژن های 16S rRNA انجام و تعیین توالی در شرکت Bioneer کره جنوبی انجام شد. توالی های حاصل پس از بررسی در نرم افزار BioEdit، توسط DNA Baser مکمل سازی شد. نتیجه با جدایه های ثبت شده در NCBI از طریق N Blast مقایسه و سپس در نرم افزار WClustal هم ردیف شد.

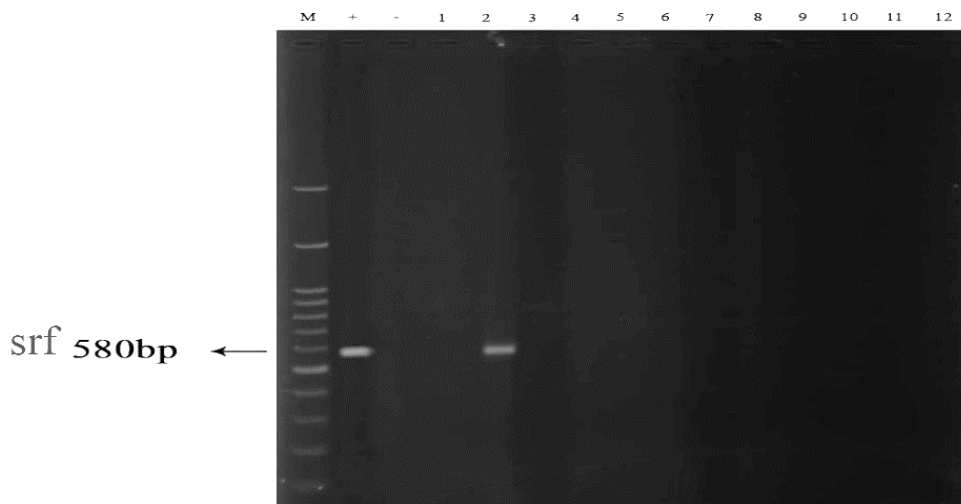
یافته ها

واکنش PCR برای بررسی فراوانی ژن *srf* با پرایمر اختصاصی انجام و نتایج واکنش PCR برای حضور ژن *srf* (580 bp) مثبت بود (شکل ۱).

مقدار مصرف آب دیونیزه به میزان نصف حجم هر واکنش بود. برنامه ی حرارتی مورد استفاده شامل: ۹۵ درجه سانتی گراد ۵ دقیقه، سپس ۳۵ چرخه دمایی به ترتیب با ۹۵ درجه سانتی گراد ۳۰ ثانیه، ۵۶ درجه سانتی گراد ۳۰ ثانیه، ۷۲ درجه سانتی گراد یک دقیقه، و یک مرحله نهایی ۷۲ درجه سانتی گراد ۱۰ دقیقه تنظیم شد. سپس محصول PCR در ژل آگاروز ۱/۵ درصد الکتروفورز گردید و به عنوان جایگزین اتیدیوم بروماید از رنگ سایبرگرین برای رنگ آمیزی استفاده شد و با استفاده از نور UV مورد ارزیابی قرار گرفت و در نهایت محصول PCR با توالی یابی و کنترل مثبت در تست تأیید گردید.

• کلون کردن ژن *srf*

به منظور کلونینگ سریع تر و مؤثرتر محصول PCR با استفاده از آنزیم DNA 4Tligase از روش TA-Cloning استفاده شد. در این روش از یک وکتور خطی به نام T-PTG19 که در انتهای 3' آن باز تیمین قرار دارد، استفاده شد. محتوای واکنش به سلول پذیرای باکتری *E. coli* XL1blue انتقال یافت. برای کلون کردن محصول PCR، از کیت شرکت سیناکلون PCR TA-Cloning استفاده شد. وکتور T-PTG19 به عنوان ناقل، BamHI به عنوان آنزیم محدودگر و سویه *E. coli* XL1blue به عنوان میزبان استفاده شد. غربالگری ورود وکتور به میزبان توسط محیط دارای آمپی سیلین و شناسایی باکتری های نو ترکیب توسط غربالگری سفید-آبی در محیط IPTG-XGAL انجام شد. تأیید حضور ژن *srf* درون کلونی های سفید توسط انجام PCR مشاهده شد و با پرایمرهای M13 که داخل باکتری بوده ردیابی شد و سپس تعیین توالی ناحیه مذکور (محل حضور ژن *srf*) و همچنین مقایسه ی طول

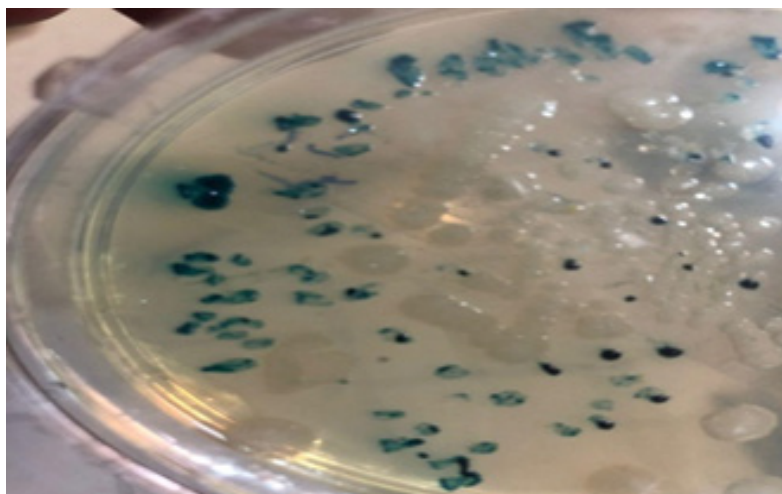


شکل ۱: نتیجه بررسی فراوانی ژن *srf* با آزمون PCR با استفاده از یک جفت پرایمر *srf*، 580 bp

ستون ها به ترتیب از چپ به (است: M) (کر (با فاصله ۱۰۰ نوکلئوتید)، کنترل مثبت، کنترل منفی، نمونه های ۱ تا ۱۲.

داده شده است که موید وجود کلنی‌های نوترکیب در محیط کشت IPTG-Xgal است.

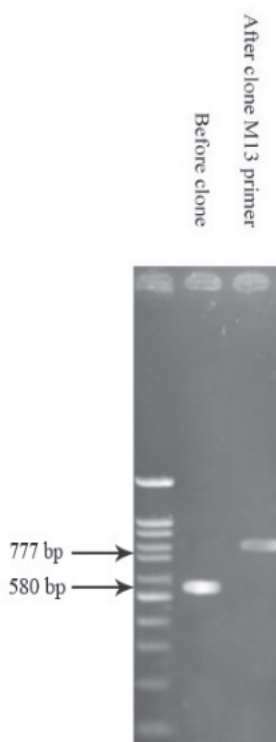
پس از کلون کردن سویه حامل ژن *srf* توسط کلنی سلکشن (آبی / سفید) سویه‌های کلون شده جدا سازی شدند. حضور کلنی‌های سفید و آبی در شکل ۲، نشان



شکل ۲: کلونی‌های سفید و آبی حاصل از تیمه کلون‌سازی ژن *srf*

کلنی‌هایی که می‌توانند در محیط رشد کنند نشان‌دهنده دریافت پلاسمید حاوی ژن مقاومت به آمپی سیلین است.

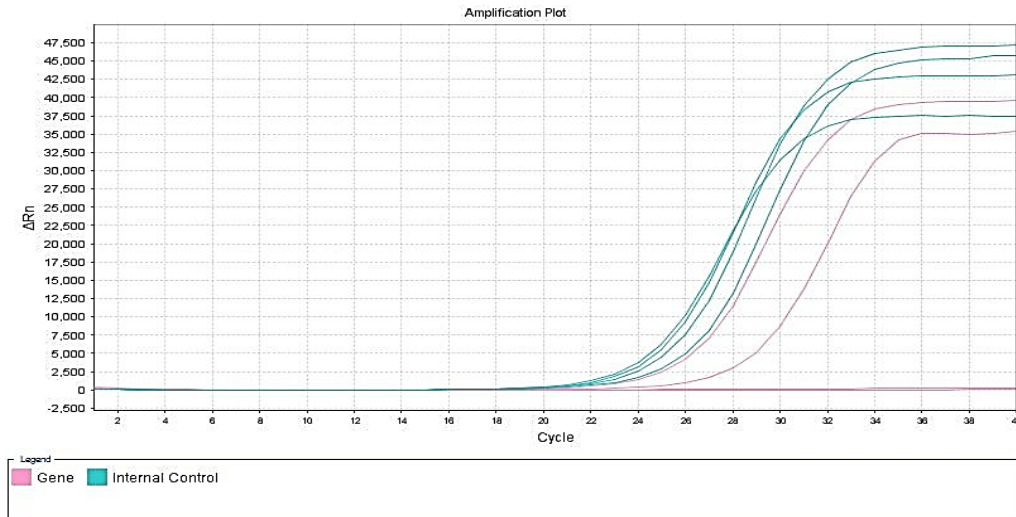
در نتیجه، تشکیل کلنی‌های سفید نشان‌دهنده این است که ژن مورد نظر ما با موفقیت کلون شده است. به علاوه چون محیط دارای آمپی سیلین می‌باشد،



شکل ۳: تأیید کلونینگ توسط PCR با پرایمرهای M13 بر روی کلون‌های نوترکیب و غیرنوترکیب و تأیید وجود قطعه insert درون وکتور نوترکیب (ژل آگاروز ۲٪)

با ساکنس محصول PCR، ورود ژن *srf* به باکتری *E.coli* XL1blue تأیید شد. همچنین منحنی سنتز Real Time PCR نیز در (شکل ۴) ارائه شده است.

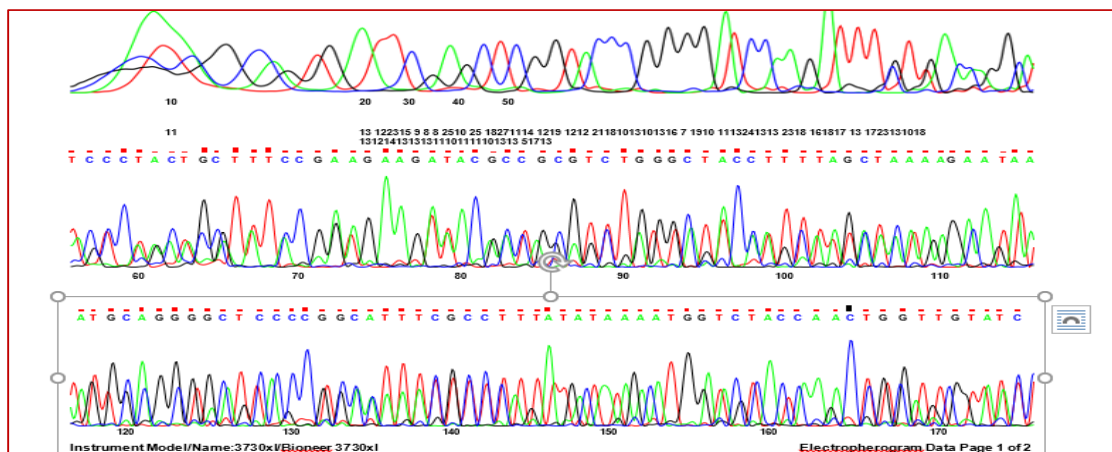
به منظور تأیید نتایج کلون، DNA از کلنی‌های مشکوک استخراج شد و با پرایمر M13 توسط آزمون PCR (شکل ۳) نشان‌دهنده‌ی باند (777 bp) بود. در نهایت



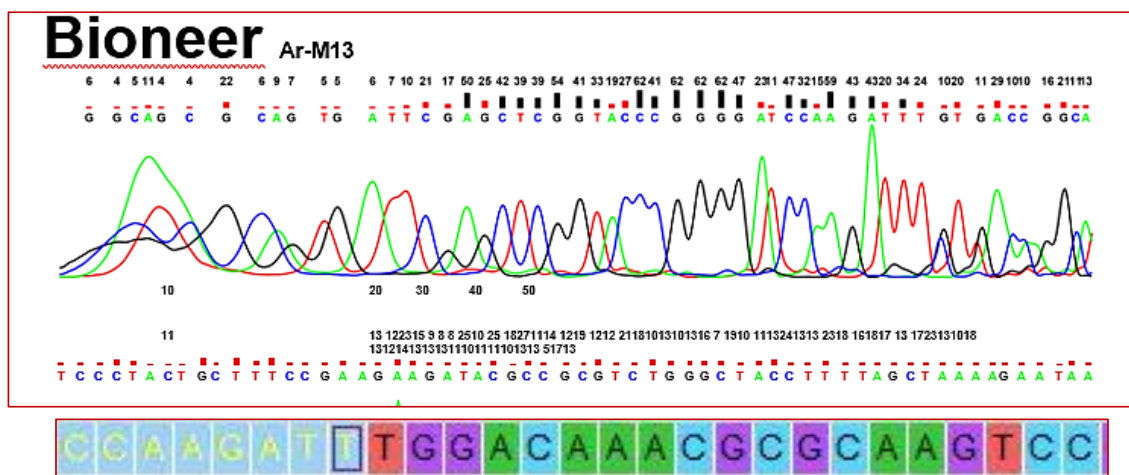
شکل ۴: منمنی تکثیر ژن *srf* توسط Real time PCR

ریلتایم کیفی استفاده شده و فقط جهت تأیید صحت کلونینگ کاربرد دارد و به پیوست داده‌های ژن موردنظر در ژن نو ترکیب گزارش شده است. نتایج ΔCT در صورت تیمار و بیان ژن موردنظر در خصوص پارامتر خاص نشان داده می‌شود.

همان‌طور که در شکل ۴ مشخص است، میزان بیان ژن *srf* در دو منحنی ایجاد شده توسط *E. coli* اولیه (آبی) و *E. coli* به کار رفته در کلونینگ ژن *srf* (صورتی)، تفاوت چشمگیری نشان می‌دهد. با توجه به انتقالی بودن ژن و غیربیانی بودن وکتور از روش



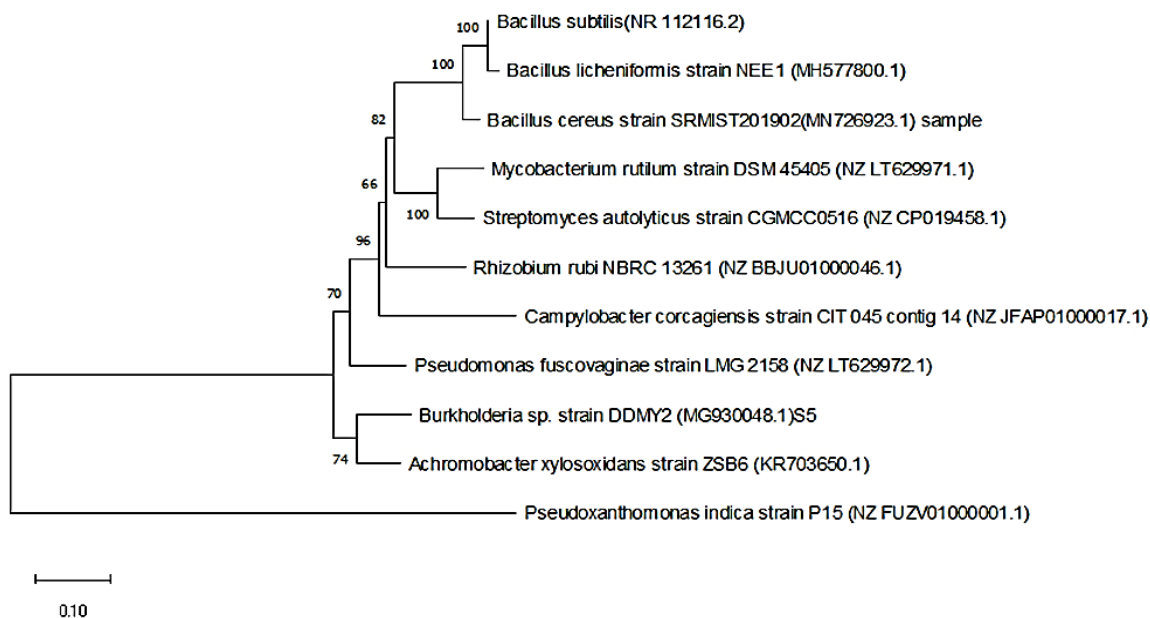
شکل ۵: نتیجه DNA سکانسینگ برای نامیه ژنی 16S rRNA



شکل ۶: محل ایجاد اتصال و سکانس مربوط به آن

با استفاده از تعیین توالی برای شناسایی جنس *Bacillus* ترموفیل تأیید شد (شکل ۵ و ۶). با استفاده از برنامه‌ی MEGA5 درخت‌های فیلوژنیک ترسیم شدند (شکل ۵).

به طوری که در نمودار آبی هیچ بیانی از ژن *stf* قابل مشاهده نیست و در مقابل در نمودار صورتی رنگ باکتری نوترکیب حاصل، میزان چشم‌گیری از پروتئین *stf* را تولید کرده است. نتیجه‌ی تکثیر ناحیه ژنی 16S rRNA



شکل ۷: درخت فیلوژنی رسم شده بر اساس توالی ژن 16S rRNA

حد نصاب (*PstfA*) ساخته و توسعه داده شد. در راستای مطالعه‌ی حاضر و همسو با آن، در پژوهش Naeem و همکاران (۲۰۱۷) به جداسازی و خصوصیات مولکولی تنوع باکتریایی تولیدکننده‌ی بیوسورفکتانت میدان نفتی فیمکاسار، پاکستان پرداختند. مکان‌های آلوده به نفت به طور بالقوه میزبان میکروارگانیسم‌های تولیدکننده‌ی بیوسورفکتانت هستند (۱۳).

stfA و *rhlB* به ترتیب مسئول تولید بیوسورفکتانت سورفاکتین و رامنولیبید هستند. در مجموع، ۳۸ جدایه از ۷۹ جدایه مختلف باکتریایی که روی محیط‌های حاوی نفت خام رشد می‌کردند، برای تولید بیوسورفکتانت غربالگری شدند. بدیهی است که ۳۴/۲٪ (n=۱۳) از جدایه‌ها ژن *stfA* را به ارث می‌برند، در حالی که ۱۵/۸٪ (n=۶) از جدایه‌ها حاوی ژن *rhlB* بودند. بیشترین تولید از نظر فعالیت‌های بیوسورفکتانت توسط سویه SWW1 *Bacillus subtilis* سوبتیلیس نشان داده شد. ماهیت سورفاکتین بیوسورفکتانت تولید شده توسط کروماتوگرافی لایه نازک و طیف سنجی مادون قرمز تأیید شد (۱۳).

در مطالعه‌ی Richard-Greenblatt و همکاران (۲۰۲۲)، به منظور ارزیابی

روابط فیلوژنتیکی بین گونه *Bacillus subtilis* سرئوس با استفاده از ژن 16S rRNA بررسی گردید. نتایج درخت فیلوژنتیکی به روش پیوند همجواری (NJ) نشان می‌دهد که گونه‌های *Bacillus subtilis* سوبتیلیس با بوت استرپ ۱۰۰٪ با *Bacillus subtilis* سرئوس در یک کلاد (خوشه) قرار گرفتند که بیانگر رابطه‌ی خویشاوندی نزدیک آن‌ها با هم بود (شکل ۷).

بحث

Bacillus subtilis های گرم مثبت بسیار مهم با کاربرد بیوتکنولوژیکی ارزشمند است که به طور گسترده برای تولید بیش از حد پروتئین‌های مرتبط صنعتی و دارویی استفاده شده است. انواع مختلفی از سیستم‌های بیانی از نظر انواع الگوهای رونویسی وجود دارد که در میان آن‌ها، محرک‌های القایی خودکار و وابسته به فاز رشد به دلیل ویژگی مستقل از القا، مورد توجه فزاینده‌ای قرار می‌گیرند و امکان افزایش مقیاس صنعتی را فراهم می‌کنند. برای گسترش کاربرد سیستم بیان خودکار القایی، یک سیستم بیان خودکار تنظیمی جدید همراه با تراکم سلولی در *Bacillus subtilis* سوبتیلیس با استفاده از پروموتور *stfA* مربوط به سنجش



تولید سورفکتین از باکتری، شناسایی ژن تولیدکننده آن (*stf*) و تعیین مقدار سورفکتین تولیدشده به ترتیب از روش های متلاشی شدن فطره (Drop collapse)، روش مولکولی واکنش زنجیره ای پلیمرز (۱۴) و در مطالعه کشاورزی و همکاران (۲۰۱۸)، آنالیز کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) استفاده شد. بررسی مولکولی با آغازگر اختصاصی نشان داد که گونه باسیلوس دارای ژن *stf* بود (۱۵). مطالعه فوق به ارزیابی تولید سورفکتانت میکروبی پرداخته است که با مطالعه حاضر همسوست.

در مطالعه Swaathy و همکاران (۲۰۱۴) به بررسی و ارزیابی تنوع گونه های باسیلوس دریایی و تولید بیوسورفکتانت پرداختند. از میان ۲۰۰ گونه ای غربال شده، پنج گونه ای باکتریایی بالقوه تولیدکننده بیوسورفکتانت با مورفولوژی کاملاً متفاوت انتخاب شدند. تجزیه و تحلیل توالی ژن بیوشیمیایی و 16S rRNA نشان داد که تمام پنج گونه ای مذکور متعلق به جنس باسیلوس بودند. بیان ژن *stf* در هر پنج گونه مشاهده شد (۱۶). در نتایج فیلوژنتیکی این پژوهش که به روش پیوند همجواری (NJ) نشان داد که گونه های باسیلوس سویتیلیس با بوت استرپ ۱۰۰٪ با باسیلوس سرئوس در یک کلاد (خوشه) قرار دارد و میزان بیان ژن *stf* در دو منحنی ایجادشده توسط *E. coli* اورینگامی به کاررفته در کلونینگ ژن *stf* (صورتی)، تفاوت چشمگیری را نشان می دهد. بیوسورفکتانت ها، مولکول های دو گانه دوست منحصر به فردی هستند که کاربرد وسیعی در حذف آلودگی های آلی و فلزی محیط زیست دارند. در میان باکتری های زیست مهارگر، باکتری باسیلوس سرئوس در تولید طیف وسیعی از ترکیبات ضد میکروبی مطرح می باشد که از این میان، بیوسورفکتانت ها از جمله سورفکتین از اهمیت ویژه ای برخوردار است (۱۷ و ۱۸).

همچنین نتایج بررسی های فیلوژنتیکی انجام شده در مطالعه حاضر قادر است، تعدادی از خویشاوندان نزدیک باکتری باسیلوس سویتیلیس را به عنوان کاندیدای مطالعات بعدی و نیز منبعی از ژن *stf* مورد بحث، معرفی نماید. با انجام مطالعات بیشتر بر روی سایر سویه های تولیدکننده سورفکتانت و نیز به کار بردن میزان های کلونینگ پر توان تر، می توان تحقیق انجام شده در مطالعه حاضر را تکمیل کرد و نقاط ضعف آن را که ممکن است در انتخاب میزبان یا سویه تولیدکننده سورفکتانت و یا روش کلونینگ به کار رفته باشد، جبران کرد. همچنین لازم است که در مطالعات آینده، پروتئین SRF تولیدشده به روش کلونینگ، ارزیابی ساختاری و عملکردی گردد. عوامل محدودیت، مجموعه

عواملی هستند که در اختیار پژوهشگر نیستند اما در یافته ها و دستاوردهای پژوهشی تأثیرگذار هستند. از عمده ترین ارکان تحقیق و پژوهش دسترسی به آمار و اطلاعات است که جزیی از محدودیت ها هستند. محدودیت در اثربخشی، یکی دیگر از محدودیت های موجود است. از موارد مهم که در محدودیت ها می تواند مطرح شود، نقاط ضعف و قوت ابزارهای آزمایشگاه در پژوهش است. نوآوری در پژوهش ممکن است یکی از محدودیت های پژوهش در چنین مواردی باشد. هدف از مطالعه حاضر جداسازی مولکولی ژن *stf* از باسیلوس های خاک زری گرمادوست و کلونینگ آن در سلول مستعد به منظور استفاده در صنعت بود. در نتایج فیلوژنتیکی به روش پیوند همجواری (NJ) نشان داد که گونه های باسیلوس سویتیلیس با بوت استرپ ۱۰۰٪ با باسیلوس سرئوس در یک کلاد (خوشه) قرار دارد و میزان بیان ژن *stf* در دو منحنی ایجادشده توسط *E. coli* اورینگامی به کاررفته در کلونینگ ژن *stf* (صورتی)، تفاوت چشمگیری را نشان می دهد.

نتیجه گیری

بیوسورفکتانت ها، سورفکتانت هایی با منشا زیستی هستند که از نظر ساختاری متنوع بوده و بسته به نوع بیوسورفکتانت نقش های متفاوتی در طی چرخه زندگی ارگانیسم ایفا می کنند. با توجه به سمیت کمتر و همچنین منحصر به فرد بودن این مولکول ها نسبت به سورفکتانت های سنتزی ارجحیت دارند. در این پژوهش، ژن *stf* از باسیلوس ترموفیل جداسازی شد و با موفقیت به باکتری *E. coli* منتقل شد تا بیوسورفکتانت با توان بالاتر و صرفه ای اقتصادی بیشتر در *E. coli* به صورت نو ترکیب تولید شود که کلونینگ آن به وسیله باکتری اشرشیاکلی اوراگامی برای دستیابی به اهداف صنعتی موفقیت آمیز بود. همچنین بررسی بیشتر برای پیدا کردن سویه های جدید تولیدکننده ژن *stf* می تواند منجر به پیدا کردن منابع بیشتر گردد.

تشکر و قدردانی

این مطالعه بخشی از پایان نامه کارشناسی ارشد می باشد و نتیجه ای طرح تحقیقاتی با کد اخلاق IR.IAU.KERMAN.REC.1401.076 مصوب معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد سیرجان می باشد. نویسندگان بر خود لازم می دانند از معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد سیرجان تقدیر و تشکر نمایند.

References

1. Mikulik K, Melcova M & Zidkova J. Antibacterial peptides from thermophilic bacteria. *International Journal of Engineering Research and Science (IJOER)* 2017; 3(5): 46-57.
2. Toth R, Nosek J, Mora-Montes HM, Gabaldon T, Bliss JM, Nosanchuk JD, et al. *Candida parapsilosis*: From genes to the bedside. *Clinical Microbiology Reviews* 2019; 32(2): e00111-18.
3. Shivilata L & Satyanarayana T. Thermophilic and alkaliphilic Actinobacteria: Biology and potential applications. *Frontiers in Microbiology* 2015; 6(1): 1014.
4. Soberon-Chavez G. *Biosurfactants: From genes to applications*. Verlag Berlin Heidelberg: Springer; 2011: 79-83.
5. Gaur VK & Manickam N. *Microbial biosurfactants: Production and applications in circular bioeconomy*. Biomass, biofuels, biochemicals, circular bioeconomy - current status and future outlook. Amsterdam, Netherlands: Elsevier; 2021: 353-78.
6. Banat IM, Franzetti A, Gandolfi I, Bestetti G, Martinotti MG, Fracchia L, et al. Microbial biosurfactants production, applications and future potential. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2010; 87(2): 427-44.
7. Campos JM, Montenegro-Stamford TL, Sarubbo LA, De-Luna JM, Rufino RD & Banat IM. Microbial biosurfactants as additives for food industries. *Biotechnology Progress* 2013; 29(5): 1097-108.
8. Das P, Mukherjee S & Sen R. Genetic regulations of the biosynthesis of microbial surfactants: An overview. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews* 2008; 25(1): 165-85.
9. Ovando-Chacon SL, Tacias-Pascacio VG, Ovando-Chacon GE, Rosales-Quintero A, Rodriguez-Leon A, Ruiz-Valdiviezo VM, et al. Characterization of thermophilic microorganisms in the geothermal water flow of El Chichon volcano Crater Lake. *Water* 2020; 12(8): 2172.
10. Eze U, Okonji R, Ibraheem O & Shonukan O. Isolation and characterization of a bacterial thermostable protease from poultry dung. *Ife Journal of Science* 2011; 13(2): 289-97.
11. Alipour-Asadabadi Z, Malekian M, Soleimani M & Mirdamadian H. Isolation and molecular identification of hydrocarbon-degrading bacteria from soil around Tabriz refinery. *Quarterly Scientific-Research Environmental Sciences* 2017; 15(2): 129-40[Article in Persian].
12. Plaza G, Chojniak J, Rudnicka K, Paraszkiwicz K & Bernat P. Detection of biosurfactants in *Bacillus* species: Genes and products identification. *Journal of Applied Microbiology* 2015; 119(4): 1023-34.
13. Naeem AH, Mumtaz S, Haleem A, Qazi MA, Malik ZA, Dasti JI, et al. Isolation and molecular characterization of biosurfactant-producing bacterial diversity of Fimkassar oil field, Pakistan. *Arabian Journal for Science and Engineering* 2017; 42(6): 2349-59.
14. Richard-Greenblatt M, Wang R, Worrall A, Blumberg E, Liu P, Doyon J, et al. Answer to march 2022 photo quiz. *Journal of Clinical Microbiology* 2022; 60(3): e0098021.
15. Keshavarzi S, Ahmadzadeh M, Mirzaei S, Behboudi K & Bandehpour M. Enhancing surfactant production in *Bacillus subtilis* UTB96 by fermentation optimization. *Journal of BioControl in Plant Protection* 2018; 5(2): 13-26[Article in Persian].
16. Swaathy S, Kavitha V, Sahaya-Pravin A, Sekaran G, Mandal AB & Gnanamani A. Phylogenetic framework and biosurfactant gene expression analysis of marine, bacillus spp. of eastern coastal plain of tamil nadu. *International Journal of Bacteriology* 2014; 2014(1): 860491.
17. Guan C, Cui W, Cheng J, Zhou L, Guo J, Hu X, et al. Construction and development of an auto-regulatory gene expression system in *Bacillus subtilis*. *Microbial Cell Factories* 2015; 14(1): 150.

18. Malaki MS, Rouhi L & Khashei-Varnamkhasti Kh. Apoptotic induction in human colorectal adenocarcinoma cell line and growth inhibition of some gastrointestinal pathogenic species by lactobacillus sakei metabolites. Journal of Payavard Salamat 2021; 14(6): 476-83[Article in Persian].

The Molecular Isolation of the *srf* Gene from Thermophilic Soil Bacilli and Its Cloning in Susceptible Cells for Industry Use

Maryam Pourmehdi¹ (M.S.), Nooshin Khandan Dezfully^{2*} (Ph.D.), Kumarss Amini³ (Ph.D.)

¹ Master of Science in Microbiology, Sirjan Branch, Islamic Azad University, Sirjan, Iran

² Assistant Professor, Department of Microbiology, Sirjan Branch, Islamic Azad University, Sirjan, Iran

³ Professor, Department of Microbiology, Saveh Branch, Islamic Azad University, Saveh, Iran

Abstract

Received: 7 Jul. 2023

Accepted: 10 Sep. 2024

Background and Aim: Thermophilic bacillus is a type of thermophilic bacillus, carries various genes and biosurfactants, microbial surfactants are surface active molecules produced by various microorganisms such as bacteria, yeasts and filamentous fungi. Biosurfactants are able to reduce the surface energy between phases and create electrostatic barriers, thus preventing the integration of particles. The aim of the present study was the molecular isolation of the *srf* gene from thermophilic soil bacilli and its cloning in susceptible cells for industry use.

Materials and Methods: Fifteen samples from different regions of Kerman were collected and screened to isolate Bacillus strains. Morphological and biochemical studies were done to identify the strains. After biochemical examination of isolated microbial isolates and confirmation of Bacillus strains, DNA extraction was done. Then, the *srf* gene was identified by PCR method from these isolates. The amplified fragment was inserted into pTG19 vector by TA cloning method. Then, the recombinant vector was transformed into *E.coli* origami bacteria and cloning was confirmed using common methods. The housekeeping gene 16S rRNA was used as the internal control of the test. The analysis of the gene expression level was performed by measuring the relative expression of mRNA as compared to the negative control that *E.coli* bacteria lacked the *srf* gene.

Results: A total of 12 isolates of thermophilic bacilli were obtained from soil samples. As result, the PCR reaction for the *srf* gene with the designed primers was found to be positive in 1 isolate (8.3%). The presence of *srf* gene and the expression of this gene were checked by real time PCR test. Examining the white and blue colonies, M13 primer, junction location and determination of the 16S rRNA gene sequence confirmed the correctness of the cloning of the mentioned gene in the host bacteria.

Conclusion: As a result of the present study, it was possible to identify the native thermophilic bacillus carrying the *srf* gene, which can be used to obtain biosurfactant enzyme widely, conveniently and economically, for use in industrial and agricultural purposes, removing oil pollutants and reducing environmental surface tension, etc. which can be advantages.

Keywords: Biosurfactant, Bacillus, Thermophile, Cloning, *E.coli*

* Corresponding Author:

Khandan Dezfully N

Email:

khandan22@iau.ac.ir